

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**BEST AVAILABLE COPY**



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In Re Application of

Fernand Narbey Torossian

Group Art Unit: 1641

Serial No. 09/125,747

Examiner: Devi, S.

Filed: August 25, 1999

For: ANTI-HELICOBACTER VACCINE COMPLEX

Attorney Docket No: TORO 0101 PUS

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first-class mail in an envelope addressed to: Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on:

9/15/00  
Date of Deposit

[Signature]  
Signature

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Attached hereto is a Certified Copy of Priority Document No. 96 02445 filed  
02/26/96 in France.

Respectfully submitted,

By: [Signature]  
John A. Artz  
Reg. No. 25,824  
28333 Telegraph Road, Suite 250  
Southfield, MI 48034  
Phone: (248) 223-9500

Dated: September 15, 2000

GP1641  
RECEIVED P#14  
SEP 27 2000  
TECH CENTER 1600/2900

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **25 AOUT 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

BEST AVAILABLE COPY

**REQUETE**  
**EN DÉLIVRANCE D'UN**  
**TITRE DE PROPRIÉTÉ**  
**INDUSTRIELLE \***

1

a	<input checked="" type="checkbox"/> BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/> DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/> TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, précisez : Nature, N° et date de la demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRÉ DU RAPPORT DE RECHERCHE

☐ OUI

☒ NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE PHYSIQUE IL REQUIERT LE PAIEMENT ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE DE RAPPORT DE RECHERCHE

☒ OUI

☐ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES
26.02.96
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL
96 02445-
CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT
99

DATE DE DÉPÔT

26 FEV. 1996

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

Cabinet MORELLE et BARDON  
BP 4127  
31030 - TOULOUSE la

7 TITRE DE L'INVENTION

COMPLEXE IMMUNOMODULATEUR ET SES UTILISATIONS POUR LE TRAITEMENT ET LA PREVENTION DES RECIDIVES DES AFFECTIONS PAR HELICOBACTER

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN.

TOROSSIAN Fernand Narbey

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

PAYS

10, rue Noël Ballay, 31400 TOULOUSE

France

10 NATIONALITÉ(S)

Française

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE INVENTEUR

☒ OUI

☐ NON

Si la réponse est non voir notice explicative

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL REQUIERT OU A REQUIS LA RÉDUCTION DES REDEVANCES

☐ OUI

☐ NON

DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

DE RAPPORT DE RECHERCHE

DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

DE REVENDICATION (à partir de la 114)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE OU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

NEANT

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE NOM ET QUALITÉ DU SIGNAIRE-N° D'INSCRIPTION

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

TOROSSIAN Fernand

\* Cocher la case choisie

LES ENCADRÉS GRAS SONT RÉSERVÉS À L'ADMINISTRATION

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**COMPLEXE IMMUNOMODULATEUR ET SES UTILISATIONS POUR LE  
TRAITEMENT ET LA PRÉVENTION DES RECIDIVES DES AFFECTIONS  
PAR *HELICOBACTER***

La présente invention concerne un complexe vaccinal thérapeutique et préventif anti-bactérien, qui possède un pouvoir vaccinant lié à la présence d'antigènes spécifiques contre l'*Helicobacter pylori* (antérieurement appelé *Campylobacter pylori*) et non spécifiques assurant une immunomodulation.

[MARSHALL BJ, WARREN Jr.. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration *Lancet* 1984; i:1311-4)]

[MÉGRAUD F. *Helicobacter pylori*, chef de file des bactéries du mucus. *La lettre de l'infectiologue* 1993; 8 (suppl. 4): 151-9].

Il est bien connu, en bactériologie, que les antigènes de surface des parois, des membranes ou des capsules (combinés ou libérés sous forme soluble dans le milieu de culture) sont de nature glycoprotéique, polypeptidique ou polysaccharidique.

Des vaccins associant à l'acide ribonucléique d'origine ribosomale (ARN) des facteurs associatifs, telles que des substances membranaires protéoglycaniques ou polysaccharidiques, extraites de germes pathogènes, sont utilisables dans l'élaboration des vaccins acellulaires (cf. *Inf. and Immunity*, 1, 574-82, 1970 et PCT WO 94/22462).

Ces vaccins utilisent des antigènes spécifiques correspondant à des affections microbiennes spécifiquement déterminées.

Or , le pouvoir antigénique est essentiellement lié au niveau de l'ARN (des ribosomes en particulier) des cellules microbiennes, entre autres. Les Cellules Immunologiquement Compétentes (CIC) utilisent directement ces ARN comme transporteurs actifs.

Pour élaborer le complexe de l'invention, avec l'antigène sérotype bactérien d'*Helicobacter*, nous avons couplé, grâce à des liaisons de préférence covalentes, l'ARN d'origine ribosomale, de préférence, à une séquence d'acides aminés de nature glycoprotidique, présente de préférence dans le collagène de type III. Chez l'homme, le collagène représente approximativement le tiers des protéines de l'organisme. Le type III a été choisi pour sa séquence d'acides aminés et sa présence dans le derme, la paroi vasculaire et les muqueuses épithéliales digestives.

Dans notre complexe, nous utilisons comme stabilisant des fractions membranaires cellulaires issues des mêmes germes que ceux qui ont servi à l'élaboration de l'ARN ribosomal. Ces fractions membranaires contiennent la totalité des substances peptidoglycaniques et sont connues en outre comme adjuvants d'immunité.

Il est, en plus d'*Helicobacter pylori* et *hepaticus*, utile d'avoir des fractions membranaires - glucopolysacchariques ou protéoglycanes - issues de différents germes microbiens qui ont servi à fournir l'ARN par extraction de leurs ribosomes, germes connus pour leur immunogénèse (recrutement de macrophages, activation de lymphocytes T, potentialisation de la synthèse des immunoglobulines, IgA sécrétoires notamment (11 S), augmentation de la phagocytose et stimulation des cellules T dépendantes...).

Ceci a été ainsi conçu car, dans le cas précis des pathogénèses induites par *Helicobacter pylori*, *hepaticus* ou *helmannii*, l'organisme doit élaborer en plus de la réponse immunitaire spécifique humorale, une ré-

ponse cellulaire pour pallier l'inefficacité des anticorps dans la protection de l'individu.

Il est connu que la réponse à la médiation cellulaire ne donne pas lieu à la production d'anticorps, mais seulement à la génération des cellules lymphoïdes sensibilisées et spécifiques de l'antigène en cause.

Les lymphocytes T agissent par eux-mêmes et/ou par les cytokines, et on observe soit une réponse de type inflammatoire, soit une réponse cytotoxique.

Le pouvoir pathogène d'*Helicobacter* réside dans son aptitude à coloniser la muqueuse gastrique, à survivre dans le suc gastrique, et à s'y multiplier en dépit de la réponse immunitaire de l'hôte, et à générer des lésions parfois irréversibles (adénocarcinome, lymphome gastrique ou lymphomes de MALT "mucuous associated lymphoid tissue").

[PARSONNET J: *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1993, 22:89-104.

WORTHERSPOON AC , DOGLIONI C, DISS TC et al; Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993; 342:575-7.

MOHANDAS, *Helicobacter pylori* and lymphoma. *N Eng J Med* 1994; 331:746-7].

lorsque celle-ci est insuffisante lors de l'injection : résistance à la phagocytose, induction d'apoptose...etc.

[PETERSON, P.K., VERHOEF, J., SCHMELING, D. & QUIE, P.G.: Kinetics of phagocytosis and bacterial killing by human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. *J. Infec. Dis.* 136:502-509, 1977.

KIEHLBAUCH JA, ALBACH RA, BAUM I.L, CHANG KP. Phagocytosis

of *Campylobacter jejuni* and its intracellular survival in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 1985; 48:446-51].

### **Constituants du complexe vaccinal objet de l'invention**

Le complexe de l'invention comprend des molécules duales constituées par le couplage d'un bras fonctionnel d'acides aminés assurant la liaison à une cible, avec un bras génétique d'ARN correspondant à la description codée de la composition du bras fonctionnel.

**A** - Les ARN d'origine ribosomale utilisables peuvent être extraits des souches choisies dans le groupe suivant, cette liste n'étant pas limitative :

- *Helicobacter pylori* (ou *Campylobacter*) et *hepaticus*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Streptococcus* (*pneumoniae* et *pyogènes*)
- *Staphylococcus aureus*
- *Serratia marcescens*
- *Escherichia coli*
- *Salmonella typhimurium*
- *Corynebacterium* (*granulosum*, *parvum*, *acnes*)
- *Mycobacterium* (*tuberculosis*, *smegmatis*, *chelonei*)
- *Hemophilus influenzae*
- *Pneumocoque* type II
- *Rothia dento cariosus*
- *Bacterium coli*
- *Shigella dysenteriae*
- *Enterococcus*
- *Nocardia* (*astéroïdes*, *brasiliensis*, *rhodocrans*, *opaca*, *rubra*)
- Bacille de Calmette et Guérin,

ou d'un mélange de celles-ci.

Les poids moléculaires moyens de ces ARN se situent entre 5 104 et 108 Dalton.

De multiples procédés industriels existent pour la préparation de l'ARN. Nous citerons comme exemple le procédé d'extraction d'ARN décrit dans Infect. and Immunity, 1, 574-82, 1970 : les bactéries sont broyées puis soumises à une précipitation fractionnée, les protéines ribosomales sont solubilisées, l'ARN précipité est traité par Pronase et, enfin, purifié par chromatographie échangeuse d'ions.

Si l'ARN est obtenu par voie enzymatique, la purification finale peut être faite par chromatographie de tamisage moléculaire. Voir notamment à ce sujet :

- C. EHRESMAN (1972) - Biochimie, 54, 901
- H. KAGAWA (1972) - J. Biochem., (1972), 827
- M. SANTER (1973) - J. Bact., 116, 1304
- NOMURA (1974) - Ribosomes - Ed. Cold Spring Harbor Laboratory.

**B** - Les fractions membranaires de cellules bactériennes utilisables peuvent être extraites des souches suivantes, les listes données n'étant pas limitatives :

1 - pour les polysaccharides capsulaires

- a. Helicobacter pylori et hepaticus
- b. Klebsiella pneumoniae
- c. Streptococcus pneumoniae
- d. Hemophilus influenzae
- e. Escherichia coli
- a. Helicobacter pylori et hepaticus

[HILLS BA, Gastric mucosal barrier: evidence for Helicobacter pylori ingesting gastric surfactant and deriving protection from it. Gut, 1993

May: 34(5):588-93.

GENTA RM; ROBASON GO; GRAHAM DY. Simultaneous visualization of *Helicobacter pylori* and gastric morphology: a new stain. *Human Pathology*; 1994 Mar: 25(3):221-6.

MAJEWSKI, S.I., and C.S GOODWIN. 1988. Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation. *J. Infect. Dis.* 157:465-471.

GEIS, G., LEYING, H., SUERBAUM, S., MAI, U. & OPFERKUCH, W.: Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella. *J. Clin. Microbiol.* 27:436-441, 1989].

b. *Klebsiella pneumoniae*

[- C. ERBING, L. KENNE, B. LINBERG, J. LONNGREN (1976) - Structural studies of the capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* type I (*Carbohydr. Res.*, 50 (1976) 115-20).

- W. NIMMICH (1968) - Zur Isolierung und qualitativen Bausteinanalyse der K. Antigene von Klebsiellen (*Med. Mikrobiol. und Immunol.*, 154, 117, 131).

- C. RICHARD (1973) - Etude antigénique et biochimique de 500 souches de *Klebsiella* (*Ann. Biol. Clin.*, 1973)].

c. *Streptococcus pneumoniae* :

[- F. KAUFFMANN et E. LUND (1954) (*Int. Bull. Bact. Nomencl.* 4, 125-28).

- FELTON et OTTINGER (*J. of Bacteriology*, 1942, 43, 94, 105)

- M. COLIN, M.D. MAC LEOD et coll. - Prevention of pneumococcal pneumoniae by immunization with specific capsular polysaccharides (*J.*

Exp. Med., 1945, 82, 445-65).

- A.R. DOCHEZ et O.T. AVERY - The elaboration of specific soluble substance by Pneumococcus during growth (1971) ( J. Exp. Med. 26, 477-93).

- WEST PHAL et LUDERITZ (1952) (Z. Naturf. 7B, 148).

- C.P.J. GLAUDEMANS et H.P. TREFFERS - An improved preparation of the capsular polysaccharide from from *Diplococcus pneumoniae* (Carbohydr. Res. 1967, 4, 181-84)].

d. Hemophilus influenzae (polysaccharide capsulaire de type poly-ribose-phosphate)

- [- P. ANDERSON et coll. (1972) - Immunization of humans with poly-ribosephosphate, the capsular antigen of *Hemophilus influenzae* type B (J. of Clin. Invest., vol. 51, 1972, 39-44).

- P. ANDERSON et coll. (1977) - Isolation of the capsular polysaccharide from supernatant of *Hemophilus influenzae* type B (Infect. and Immun., 1977, 15 (2), 472-77)].

e. Escherichia coli (polysaccharides capsulaires)

- [- LUDERITZ et coll. (1977) - Somatic and capsular antigens of gram-negative bacteria (Compr. Biochem. 26 A, 105-228).

- BOYER H.W., and D. ROULLAND-DISSOIX. (1969) - A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli* J. Mol. Biol. (41:459-472).

- CASADABAN, M., and S. N. COHEN (1980) - Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *E. coli* J. Mol. Biol. (138:179-207).

- LUGTENBERG, B., J. Meijers, R. Peters, P. van der Hock, and L. van Alphen (1975) - Electrophoretic resolution of the "major outer membrane protein" of *Escherichia coli* K12 into four bands. (FEBS Lett. 58:254-258)].

2 - Pour les lipopolysaccharides membranaires (LPS)- *Corynebacterium* (avidum, bovis, diphtheriae, enzymicum, equi, fascians, flaccum, faciens, flavidum, fusiforme, granulorum, helvolum, hypertrophicans, insidiosum, liquefaciens, parvum, paurometabolum, pyogenes, tumescens, xerosis)

- et les gram-moins :

- *Helicobacter pylori*
- *Klebsiella* (pneumoniae et rhinoscleromatis)
- *Salmonella typhimurium*
- *Serratia* (marcescens, corralina, indica, plymuthica, kiluea)
- *Neisseria meningitidis*
- *Escherichia coli*

[GOODWIN C. S. "Helicobacter Pylori : 10th anniversary of its culture in April 1982". (Gut 1993 ; 34 : 293-4).

- C. ERBIN et coll. (1977) - Structural studies on the *Klebsiella* LPS (Carbohydr. Res., 56, 377-81).

- C.B. CASTOR et coll. (1971) - Characteristics of a highly purified pyrogenic LPS of *Klebsiella pneumoniae* (J. of Pharm. Sci., 60, (10), 1578-80).

- K. FUKUSHI (1964) - Extraction and purification of endotoxin from Enterobacteriaceae: a comparison of selected methods and sources (J. of Bacteriol. 87, (2), 391-400).

- G.A. LIMJUCO - Studies on the chemical composition of LPS from *Neisseria meningitidis* group B (J. of Gen. Microbiol. 1978, 104, 187-91).

- G.A. ADAMS (1967) - Extraction of LPS from gram-negative bacteria with DMSO (Canad. J. Biochem., 45, 422-26).

- K.G. JOHNSON (1976) - Improved techniques for the preparation of bacterial LPS (Canad. J. Microbiol. (22), 29-34).



- Y.B. KIM et coll. (1967) - Biologically active endotoxins from *Salmonella mutans* (J. of Bacteriol., 94, (5), 1320-26)].

### 3 - Pour les protéines membranaires

- *Helicobacter Pylori*
- *Escherichia coli*
- *Serratia marcescens*
- *Streptococcus pyogènes*
- *Salmonella typhimurium*.

#### *Helicobacter Pylori*

- GOBERT (B.), LABIGNE (A.), de KORWIN (J.D.), CONROY (M.C.), BENE (M.C.), FAURE (G.C.) - Polymerase chain reaction for *Helicobacter pylori*. (Rev. Esp. Enf Digest. 1980, 78 (suppl 1), 4.

- TOWBIN, H., T. STAEGELIN, and J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354.

#### *Escherichia coli*

- S.F. STIRM et coll. (1967) - Episome, carried surface antigen K 88 of *Escherichia coli* (J. of Bacteriol., 93, (2), 731-39).

- S.J. BETZ et coll. (1977) - Chemical and biological properties of a protein rich fraction of bacterial LPS (J. of Immunol., 119, (4), 1475-81).

#### *Serratia marcescens*

- W. WOBER (1971) - Studies on the protein moiety of endotoxin from gram-negative bacteria, characterisation of the protein-moiety isolated by acetic acid hydrolysis of endotoxin of *Serratia marcescens*.

#### *Streptococcus pyogènes*

- M.K. WITTNER (1977) - Homologous and heterologous protection of mice with group-A Streptococcal M protein vaccine (Infect. and Immun.,

1977, 15, (1), 104-8).

Salmonella thyphimurium

- N. KUUSI et coll. (1979) - Immunization with major outer membrane protein in experimental salmonellosis of mice (Infect. and Immun., 1979, 25, (3), 857-62).

- C. BARBER et coll. (1972) - The protective role of proteins from Salmonella thyphimurium in infection of mice with their natural pathogen (Rev. Immunol., 36, 77-81).

- G. DELORD (1979) - Etude d'un antigène vaccinant contenu dans le surnageant de culture de Salmonella thyphimurium, souche M-206, thèse de médecine de Lyon n° 428, 1979.

- G.W. GOODMAN (1979) - Characterization of the chemical and physical properties of a novel B-lymphocyte activator endotoxin protein (Infect. and Immun., 1979, 24 (3), 685-96).

4 - Pour les acides teichoïques et lipoteichoïques

Streptocoques, staphylocoques, et lactobacilles (la surface des bactéries gram-positives est faite d'acide teichoïque, qui est un polymère du glycérol, lié par des ponts phosphodiesters).

Les articles suivants décrivent les procédés d'obtention :

- M.M. BURGER (1966) - Teichoic acids: antigenic determinants, chain separation, and their location in the cell wall (Microbiology 56, 910-17).

- K.W. KNOX (1973) - Immunological properties of teichoic acids (Bacteriol. Reviews, 37, 21, 215-57).

- G.A. MILLER (1976) - Effects of streptococcal lipoteichoic acid on host response in mice (Infect. and Immun., 1976, 13, (5), 1408-17).

- A.J. WICKEN et coll. (1975) - Lipoteichoic acids: a new class of bac-

terial antigens (Science, 187, 1161-67).

### **Différents dosages possibles**

#### A.R.N.

\* FISKE et SUBBAROW - Dosage du phosphore. Chromatographie HPLC sur colonne échangeuse d'ions pour le contrôle qualitatif (J. Biol. Chem. (1926), 66, 375).

#### Protéines

\* LOWRY (J. Biol. Chem. (1951), 193, 265-75).

#### Hexoses

\* T.A. SCOTT - Dosage colorimétr. à l'anthrone (Anal. Chem. (1953), 25, 1956-61).

#### Hexosamines

\* L.A. ELSON (Biochem. J (1953), 27, 1824-28).

#### Lipopolysaccharides

\* J. JANDA et E. WORK (Febs Letters, 1971, 16 (4), 343-45).

C - Les autres facteurs adjuvants de l'immunité, en plus des fractions membranaires, sont

- du collagène type III
- du chlorure de sodium

Le collagène de type III utilisé est caractérisé par :

a - des séquences d'acides aminés voisines de la séquence suivante

(les concentrations sont exprimées en g/kg) :

- acide aspartique AA 51,5
- hydroxyproline HP 107,0
- thréonine TH 16,1
- sérine SE 27,8
- acide glutamique AG 95,9

- proline	PR	124,0
- glycine	GL	149,0
- alanine	AL	87,9
- valine	VA	23,3
- méthionine	ME	7,5
- isoleucine	IL	14,4
- leucine	LE	27,8
- tyrosine	TY	6,7
- phénylalanine	PA	14,4
- lysine	LY	28,6
- histidine	HI	5,5
- arginine	AR	73,0

b - l'analyse-type suivante :

- couleur                      blanc jaunâtre
- densité apparente        250 g/l
- humidité                    6 %
- pH d'une solution à 10 % 6,9
- viscosité Engler à 40°C 2,5  
(solution à 17,75 %)
- taux de matières grasses 0,9 %
- taux de cendres            2,2 %
- taux de Fe + Cu + Ca 462 mg/kg
- métaux lourds            non décelables par spectrographie d'émission

d'arc

- analyse élémentaire    C 46,80 %  
                                     H 7,10 %  
                                     N 14,96 %

La composition du complexe vaccinal objet de l'invention, associant des ARN ou des fragments d'ARN ribosomiaux, des fractions membranaires (par exemple protéoglycanes de *Klebsiella pneumoniae*) et du collagène de type III, complété par du chlorure de sodium et un anti-inflammatoire, permet, par administration de faibles doses n'entraînant aucune toxicité, d'obtenir un haut niveau de protection et de guérison.

La présentation préférée est la forme injectable de la composition ci-dessus présentée, mais il est possible d'utiliser d'autres présentations et/ou d'autres supports ou additifs compatibles avec une utilisation médicale.

#### **Mécanisme d'action du complexe vaccinal**

Ce complexe thérapeutique (vaccinal) peut être assimilé à un vaccin spécifique (par "système inerte" qui a pour but d'augmenter l'immunogénicité d'un vaccin recombinant sous-unité et des vaccins constitués des peptides), et d'un vaccin non spécifique avec les caractéristiques d'une lymphokine, qui, se fixant aux macrophages, joue un rôle essentiel dans la réponse immune vis-à-vis d'*Helicobacter pylori* [KAZI, J.I., SINNI AH, R., JAFFRAY, N.A., ALAM, S.M., ZAMAN, V., ZUBERI, S.J. & KAZI, A.M.: Cellular and humoral immune responses in *Campylobacter pylori*-associated chronic gastritis. J. Pathol. 159: 231-237, 1989].

Depuis 1974-75 (A.S. et G.P. YOUMANS), il a été constaté que l'effet d'inhibition de la réponse immune à l'ARN était réalisée par différents inhibiteurs.

YOUMANS avait travaillé sur une seule souche bactérienne (*Mycobacterium tuberculosis*), dont le "parasitisme" est uniquement intracellulaire.

VENNEMAN et coll. pensent, dès 1972, que le véritable antigène pourrait être associé à l'ARN, dont le rôle serait celui d'un adjuvant. Ils vaccinent des souris avec de l'ARN ribosomal, extrait par le phénol à 65°C de ribosomes d'une souche de *Salmonella typhimurium*. Trente jours après cette vaccination, il s'avère que les animaux sont mieux protégés que par vaccin souche vivante (atténuée).

Il est surtout constaté que le niveau de protection est fonction de la quantité d'ARN injectée.

Par exemple : l'ARN ribosomal extrait de *Streptococcus pneumoniae* induit une protection de nature humorale et l'ARN ribosomal extrait de *Klebsiella pneumoniae* induit une protection de nature cellulaire.

[TRIEU-CUOT, P., G. GERBAUD, T. LAMBERT, and P. COURVALIN (1985) - In vivo transfer of genetic information between gram-positive and gram-negative bacteria. (EMBO J. 4:3583-3587)].

Ce mélange, injecté in vivo sur souris et cobayes, exerce une action sur les macrophages alvéolaires.

Cet effet "transitoire" se retrouve en dosant la phosphatase acide des plages d'hémolyse directe au contact des cellules spléniques de souris.

Le traitement par notre complexe thérapeutique et vaccinal est, quant à lui, suivi d'un effet immunostimulant cellulaire et humoral, avec une action spécifique et non spécifique, significative, sur les *Helicobacter pylori*. C'est l'organisme du patient lui-même qui est sollicité pour "rejeter les cellules infectées". On obtient une guérison par l'action des PMNs (Polymorphonuclear leukocytes) et des monocytes simultanément sollicités.

[ANDERSEN LP; NIELSEN H, Survival and ultrastructural changes of *Helicobacter pylori* after phagocytosis by human polymorphonuclear leu-

kocytes and monocytes. APMIS; 1993 Jan; 101(1); 61-72]

[STEIGBIGEL, R. T., LAMBERT, L. H. & REMINGTON, J..S.: Phagocytic and bactericidal properties of normal human monocytes. J. Clin. Invest. 53: 131-142, 1974]

[YAM, L.T., Li, C. Y. & CROSBY, W.H.: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am. J. Clin. Pathol. 55: 283-290, 1971].

Ce mécanisme thérapeutique permet donc de produire un clonage naturel grâce aux ARN

(ribosomaux bactériens non spécifiques) opsonisés par l'adjuvant mis au point (combinaison de protéoglycanes membranaires, de collagène de type III, de chlorure de sodium).

Ce clonage induit une vaccination contre les idiotypes des anticorps, ainsi qu'une production d'anticorps contre le site de liaison des bactéries. Pour diminuer ou inhiber la réaction inflammatoire, il est nécessaire d'utiliser, lors des traitements par le complexe vaccinal, des corticoïdes (type Betaméthazone, par exemple) sous forme de phosphate disodique, à la dose de 20 à 60 mg, par voie I.V. ou I.M.

Cette action s'accompagne également d'une production d'interféron endogène, ainsi que d'une activation des cellules N.K.

Le but de notre complexe vaccinal immuno-modulateur est donc d'induire une réponse immunitaire locale et générale ayant pour effet d'empêcher ou au moins de réduire (jusqu'à un seuil d'auto-défense possible) la prolifération d'un agent infectieux introduit dans l'organisme.

- PRUUL, H., LEE, P. C., GOODWIN, C. S. & MACDONALD, P. J. - Interaction of *Campylobacter pyloridis* with human immune defence mechanisms. (J. Med. Microbiol. 23: 233-238, 1987).

- RATHBONE, B. J., WYATT, J. I., WORSLEY, B. W., SHIRES, S. E.,

TREJDOSIEWICZ, L. K., HEATLEY, R. V. & LOSOWSKY, M; S. - Systemic and local antibody response to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia. (Gut 27: 642-647, 1986).

- STACEY, A. R., HAWTIN, P. R. & NEWELL, D. G. - Local immune responses to *Helicobacter pylori* infections. In : Malgertheimer, P. & Ditschuneit, H. (Eds.) : *Helicobacter pylori*, Gastritis and Peptic Ulcer. (Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1990, pp. 162-166).

Notre originalité thérapeutique consiste, entre autres, à modérer ou supprimer l'existence de "cellules suppressives" exerçant une action pro-infectieuse, à provoquer une réaction anti-ulcéreuse par réponse cellulaire et/ou humorale de défense. C'est la réponse thérapeutique au problème pressenti dès 1993 par Kist et Coll.

[KIST M; SPIEGELHALDER C; MORIKI T; SCHAEFER HE - Interaction of *Helicobacter pylori* (strain 151) and *Campylobacter coli* with human peripheral polymorphonuclear granulocytes]  
et à prévenir les récurrences infectieuses :

- BORODY T, ANDREWS P, MANCUSO N, JANKIEWICZ E, BRANDL S  
- *Helicobacter pylori* reinfection 4 years post-eradication; (Lancet 1992, 339:1295).

- BELL GD, POWELL KU, BURRIDGE SM, HARRISON G, RAMEH B, WEIL J, et al - Reinfection or recrudescence after apparently successful eradication of *Helicobacter pylori* infection : Implications for treatment of patients with duodenal ulcer disease. (Q J Med 1993, 86:375-382).

En conclusion, notre complexe thérapeutique agit par évolution dirigée produisant des molécules d'ARN, lesquelles, bloquent l'infection par l'*Helicobacter pylori*, et augmentent l'immunodéfense.

[SUERBAUM, S., C. JOSENHANS, and A. LABIGNE (1993) - Cloning



and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. (J. Bacteriol. 175:3278-3288).

- HAAS, R., T. F. MEYER, and J. P. VAN PUTTEN (1993) - Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. (Mol. Microbiol. 8:753-760)

- CHEN M, LEE A, HAZELL S, HU P, LI Y - Protective immunisation against *Helicobacter* the need for stimulation of common mucosal immune system (abstract). (Gastroenterology 1993, 104 (suppl): A681)].

Il a par ailleurs été constaté lors des différents essais cliniques auxquels il a été procédé, que le complexe de l'invention pouvait suppléer avec succès aux traitements conventionnels, par triple thérapie notamment, dans les cas de résistances bactériennes notoires.

#### **Techniques d'administration du complexe vaccinal**

Le complexe vaccinal peut être administré par voie orale, ou par voie parentérale :

- \* soit par injection intraveineuse directe
- \* ou par perfusion lente
- \* ou par injection sous-cutanée.
- \* ou par voie transdermique (par 24 h.)

Ces diverses techniques ont été expérimentées avec succès.

Les dosages journaliers et leur fréquence dépendent beaucoup de l'état du patient. Un surdosage ne présente aucun risque, compte tenu de la non toxicité du complexe.

Par voie intraveineuse, on peut utiliser des séquences d'une semaine

par mois, chaque jour de la semaine de traitement comportant une perfusion lente de 500 ml d'une solution renfermant :

- 0,9 % de chlorure de sodium
- 40 µg de fractions saccharidiques membranaires (protéoglycanes de *Klebsiella pneumoniae*)
- 30 µg d'ARN (ribosomal) de :
  - \* *Helicobacter pylori* 7µg
  - \* *Diplococcus pneumoniae* 7µg
  - \* *Streptococcus pyogènes* (A 12) 7µg
  - \* *Klebsiella pneumoniae* 7 µg
  - \* *Hemophilus influenzae* 2 µg
- 10 µg de collagène type III décrit ci-dessus
- 8 mg de phosphate disodique de Bétaméthazone (soit 2 ml de soluté injectable)

A ce traitement par perfusion I.V. lente, peut succéder un traitement par injections sous-cutanées sur les patients pouvant être suivis de façon ambulatoire, chaque injection contenant :

- 40 µg de fractions saccharidiques membranaires (protéoglycanes de *Klebsiella pneumoniae*)
- 30 µg d'ARN (ribosomal) de :
  - \* *Helicobacter pylori* 7µg
  - \* *Diplococcus pneumoniae* 7µg
  - \* *Streptococcus pyogène* (A 12) 7µg
  - \* *Klebsiella pneumoniae* 7 µg
  - \* *Hemophilus influenzae* 2 µg
- 10 µg de collagène type III décrit ci-dessus
- 0,5 ml de chlorure de sodium à 0,9 %

- 4 mg de phosphate disodique de Bétaméthazone (soit 1 ml de soluté injectable).

Ce traitement peut être poursuivi quelques semaines.

Par voie orale :

- par comprimés,

2 comprimés par jour, en une seule prise le matin à jeun, chaque comprimé renfermant : - 400 µg de fractions saccharidiques membranaires (protéoglycanes de *Klebsiella pneumoniae*)

- 300 µg d'ARN (Ribosomal) de :

* <i>Helicobacter pylori</i>	70 µg
* <i>Diplococcus pneumoniae</i>	70 µg
* <i>Streptococcus pyogènes</i> (A12)	70 µg
* <i>Klebsiella pneumoniae</i>	70 µg
* <i>Hemophilus influenzae</i>	20 µg

- 100 mg de Collagène type III décrit ci-dessus

- 2 mg de phosphate disodique de Betamethazone

Ce traitement peut être octroyé à raison de 2 comprimés par jour pendant un mois, suivi de périodes de rappel de deux comprimés par jour, une semaine par mois pendant 3 mois.

Par voie transdermique

Système thérapeutique transdermique adhésif composé d'un réservoir et d'une membrane perméable assurant le passage continu des principes actifs à travers la peau et dans la circulation sanguine à vitesse constante.

Le dispositif doit être collé sur une surface cutanée saine, sèche et peu pileuse (paroi latérale de l'abdomen ou du thorax par exemple).

Il comporte :

- Polymère adhésif
- Support de l'adhésif : polyéthylène
- Filtre protecteur polyester siliconé

Son contenu est le contenu d'un comprimé, et sa posologie est identique à la voie orale (à raison d'un "patch" pour 2 comprimés quotidiens).

Les exemples suivants, non limitatifs, sont communiqués pour illustrer les résultats concrets de notre complexe vaccinal thérapeutique.

#### Exemple 1

M. Robert G., 64 ans, est hospitalisé à la suite d'épigastralgies, de pyrosis et de douleurs abdominales associées à un trouble du transit avec alternance diarrhée - constipation. L'endoscopie digestive retrouve une pathologie de reflux gastro-oesophagien par béance du cardia entraînant une oesophagite et un ulcère peptique du bas oesophage.

Des biopsies sont pratiquées de même qu'un test rapide à l'uréase. Celui-ci, de même que l'anatomopathologie et la culture, confirment la présence d'*Helicobacter pylori*.

Le traitement conventionnel (antisécrétoire et deux antibiotiques) est prescrit. La trithérapie n'entraîne pas de guérison clinique.

Six semaines après la fin du traitement, le contrôle d'éradication par test respiratoire à l'urée marquée au  $^{13}\text{C}$  fait conclure en la prolifération des bactéries par sa positivité.

Le traitement par le complexe vaccinal objet de l'invention est alors pratiqué sous forme d'injections sous-cutanées.

Un mois après, on constate la guérison clinique et le test respiratoire à l'urée marquée au carbone-13 est négatif.

Six mois après, un nouveau contrôle par test respiratoire à l'urée

marquée  $^{13}\text{C}$  et l'endoscopie de contrôle montrent une guérison acquise.

Depuis un an, la guérison est définitive.

#### Exemple 2

M. Serge Y., 48 ans, présente une gastrite antrale de type B. Traitement par complexe immunomodulateur (les seuls traitements antérieurs étaient des pansements gastriques) sous forme IV. La guérison clinique est acquise quinze jours après la séquence thérapeutique. Les contrôles (test respiratoire à l'urée marquée au  $^{13}\text{C}$ ) sont négatifs depuis un an.

#### Exemple 3

M. Pierre K., présente un ulcère duodénal confirmé à l'endoscopie (+Biopsie, test à l'uréase, tests ELISA).

Le traitement par voie orale est alors instauré. Trois semaines après, la guérison clinique est obtenue.

Six semaines après, le contrôle par test respiratoire à l'urée marquée  $^{13}\text{C}$  confirme l'éradication.

Six mois après, aucune récurrence n'est enregistrée, et le test Elisa montre un taux d'anticorps non significatif (< 50 %).

#### Exemple 4

Mme Sarah L. présente un ulcère duodénal associé à une gastrite de type B.

On relève la présence de cancer gastrique dans sa fratrie. Un bilan complet pratiqué montre la positivité de tous les tests par méthode invasive : culture, histologie, amplification du génome viral (PCR), test à l'uréase.

Le traitement par voie intraveineuse sur une semaine puis par rappels sous-cutanés sur six mois est alors instauré.

Etant donné le haut risque familial, une endoscopie avec biopsie est pratiquée dès le troisième mois : PCR, cytologie, culture, CLO test, sont négatifs.

Au sixième mois, un test respiratoire ( $^{13}\text{C}$ ) confirme la guérison clinique.

## REVENDICATIONS

1. Complexe immunomodulateur, **caractérisé en ce qu'il** comprend des acides ribonucléïques, des fractions membranaires bactériennes - glycopeptides et/ou lipopolysaccharides - et des acides aminés.

2. Complexe immunomodulateur selon la Revendication 1, **caractérisé en ce que** les acides ribonucléïques (ARN) d'origine ribosomale.

3. Complexe immunomodulateur selon la Revendication 2, **caractérisé en ce que** les acides ribonucléïques d'origine ribosomale sont extraits des souches choisies dans le groupe suivant : *Helicobacter pylori* et *hepaticus*, *Campylobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* (*pneumoniae* et *pyogènes*), *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Corynebacterium* (*granulosum*, *parvum*, *acnes*), *Mycobacterium* (*tuberculosis*, *smegmatis*, *chelonei*), *Hemophilus influenzae*, *Pneumocoque* type II, *Rothia dento cariosus*, *Bacterium coli*, *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus*, *Nocardia* (*astéroïdes*, *brasiliensis*, *rhodocrans*, *opaca*, *rubra*), Bacille de Calmette et Guérin ou d'un mélange de celles-ci .

4. Complexe immunomodulateur selon la Revendication 1, **caractérisé en ce que** les acides aminés sont des acides aminés de collagène.

5. Complexe immunomodulateur selon la Revendication 4, **caractérisé en ce que** les acides aminés de collagène sont choisis dans le groupe suivant : acide aspartique, hydroxyproline, thréonine, sérine, acide glutamique, proline, glycine, alanine, valine, méthionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phénylalanine, lysine, histidine, arginine, ou d'un mélange de ceux-ci.

6. Complexe immunomodulateur selon l'une quelconque des Revendications précédentes, **caractérisé en ce qu'il** comprend des molé-

cules duales constituées par le couplage d'un bras fonctionnel d'acides aminés assurant la liaison à une cible, avec un bras génétique d'ARN correspondant à la description codée de la composition du bras fonctionnel.

7. Utilisation du complexe immunomodulateur conforme à l'une des Revendications précédentes pour le traitement des affections par bactéries *Helicobacter*, par la production d'anticorps et la production d'interféron endogène.

8. Utilisation du complexe immunomodulateur conforme à l'une des Revendications précédentes pour une vaccination anti-idiotypique contre les idiotypes des anticorps anti-bactériens permettant d'éviter les récurrences de la pathologie initiale du tractus digestif.

9. Utilisation du complexe immunomodulateur conforme à l'une des Revendications précédentes contre les résistances bactériennes aux traitements conventionnels par antibiotiques ou autres.

10. Complexe immunomodulateur et vaccinal spécifique anti-*Helicobacter* selon l'une des Revendications précédentes, **caractérisé en ce qu'il** est présenté sous un conditionnement permettant l'administration simultanée d'anti-inflammatoires majeurs du type corticoïdes, d'antibiotiques, d'antisécrétoires, (inhibiteurs de la pompe à protons, type Oméprazole ou anti H2...) ou autres produits à effets bactériostatiques, bactéricides ou bactériolytiques, pour éradiquer *Helicobacter* générant une pathogénèse par facteurs liés à la bactérie (production de différentes cytoxines, de médiateurs de l'inflammation : Interleukine I, facteur alpha de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor alpha)), ou par facteurs liés à l'hôte.

11. Complexe immunomodulateur selon la Revendication précédente, **caractérisé par** un conditionnement sous une forme telle qu'il peut être



administré par différentes voies : perfusions, injections intraveineuses, injections sous-cutanées, dispositifs transdermiques, ou per os.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**